

**ZUR ROLLE DES MEMBRANPOTENTIALS
BEIM IMPORT
MITOCHONDRIALER VORSTUFENPROTEINE**

NIKOLAUS PFANNER

1985

*Des
München*

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München
Vorstände: Prof. Dr. V. Herzog (kommiss.), Prof. Dr. E. M. Klingenberg,
Prof. Dr. Dr. W. Neupert, Prof. Dr. H. G. Zachau

**ZUR ROLLE DES MEMBRANPOTENTIALS BEIM IMPORT
MITOCHONDRIALER VORSTUFENPROTEINE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nikolaus Pfanner
aus
Simmerberg im Allgäu

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Priv.-Doz. Dr. R. Krämer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1985

Meinem sehr geschätzten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. Walter Neupert, gilt mein aufrichtiger und umfassender Dank. Diese Arbeit möge eine kleine Erinnerung an unsere Zusammenarbeit sein.

Herrn Privatdozent Dr. Reinhard Krämer danke ich herzlich für Anregungen und Diskussionen zu bioenergetischen Problemen.

Diese Arbeit sei eine Erinnerung an Professor Dr. Bob Cook, Gerd Hawlitschek, Helmut Köhler, Rupert Pfaller, Dr. Colin Robinson, Dr. Manfred Schleyer, Dr. Bernd Schmidt, Dr. Martin Schwaiger, Rosemary Stuart, Dr. Max Tropschug, Dr. Richard Zimmermann und alle anderen Mitarbeiter der Forschungsgruppe, denen ich für zahlreiche Hilfen und begeistert geführte Diskussionen danken möchte.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben Gerlinde Karl, Marlies Krammer und Sigrun Meier wesentlich beigetragen. Ihnen sei herzlich dafür gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung und Problemstellung	2
3. Material und Methoden	5
3.1. Präparation von Mitochondrien aus <i>Neurospora crassa</i>	5
3.2. Zellfreie Proteinsynthese im Kaninchen-Retikulocyten-Lysat	5
3.3. Import von ADP/ATP Carrier in Mitochondrien <i>in vitro</i>	6
3.4. Immunpräzipitation von ADP/ATP Carrier	7
3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	8
3.6. Chemikalien	9
4. Experimente und Ergebnisse	13
4.1. Eigenschaften des verwendeten Systems	13
4.1.1. Einfluß des Puffersystems auf Bindung und Import des ADP/ATP Carriers	13
4.1.2. Einfluß von Inhibitoren und Stimulatoren des mitochondrialen Membranpotentials auf den Import von ADP/ATP Carrier im Puffersystem	16
4.1.3. Trennung von Bindung und Import	16
4.1.4. Kinetik des Imports im Puffersystem	19
4.2. Untersuchungen zur Rolle des Membranpotentials für den Import	24
4.2.1. Import durch ein Kalium-Diffusionspotential	24
4.2.1.1. Bindung und Import in einer Reaktion	24
4.2.1.2. Import nach Vorbinden des ADP/ATP Carriers an den Rezeptor	25
4.2.2. Import bei verschiedenen pH - Werten	30
4.2.3. Einfluß des Protonophors CCCP auf den Import durch ein Kalium-Diffusionspotential	30

5.	Diskussion	36
6.	Zusammenfassung	41
7.	Literaturverzeichnis	43

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Antimycin A
Asc	Ascorbat
ADP	Adenosindiphosphat
AMPDS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
KCN	Kaliumcyanid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Oli	Oligomycin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Prot K	Proteinase K
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer (siehe 3.1.)
TMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Val	Valinomycin

2. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

An der Biogenese der mitochondrialen Proteine sind zwei genetische Systeme beteiligt. Die mitochondriale DNA codiert nur für einen kleinen Teil der mitochondrialen Proteine, während der Hauptanteil (über 95 %) im Zellkern codiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird. So müssen mehrere hundert verschiedene Proteine von außen in die vier Kompartimente der Mitochondrien (Außenmembran, Intermembranraum, Innenmembran und Matrix) transportiert werden. Die beiden mitochondrialen Membranen stellen aber eine Barriere für den Durchtritt von Makromolekülen dar (die Innenmembran ist auch schon für zahlreiche kleinere Moleküle undurchlässig). (18, 31, 33, 49, 53).

Somit stellt sich das grundsätzliche Problem des Durchtritts von Proteinen durch biologische Membranen. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben zwei unterschiedliche Mechanismen für den Transport von Proteinen über Membranen aufgezeigt (18, 31, 49, 53):

- a) cotranslationaler Mechanismus: während der Synthese des Proteins erfolgt bereits der Transport über bzw. in die Membran;
- b) posttranslationaler Mechanismus: fertigsynthetisierte Proteine werden über bzw. in die Membran transportiert, d.h. Translation und Transfer über die Membran sind zeitlich und räumlich voneinander getrennt.

Für Mitochondrien ist nun bekannt, daß die nucleär codierten Proteine an freien (d.h. nicht membrangebundenen) cytoplasmatischen Polysomen synthetisiert werden und dann posttranslational in die Mitochondrien aufgenommen werden. Der Transport der Vorstufenproteine im Cytosol erfolgt in Form hochmolekularer Aggregate. Die Vorstufenproteine binden an spezifische Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran. Dann erfolgt der eigentliche Import (d.h. der Transport über die Membran(en)), wobei der Transfer über bzw. in die Innenmembran energieabhängig ist. Während oder nach dem Transfer wird von zahlreichen Vorstufenproteinen durch eine in der Mitochondrienmatrix lokalisierte Protease eine N-terminale Präsequenz abgespalten. Vorstufenproteine ohne Präsequenzen unterscheiden sich in ihrer Konformation vom reifen Protein. Schließlich erfolgt häufig eine Assemblierung in größere Proteinkomplexe. (18, 31, 41, 43, 45, 49, 53, 56 - 58).

Ursprünglich wurde ATP als die benötigte Energieform für den Transfer über bzw. in die Innenmembran angesehen (30). Durch neuere Arbeiten

konnte aber das Membranpotential über der Innenmembran (außen positiv, innen negativ) als die erforderliche Energieform wahrscheinlich gemacht werden (15, 18, 43, 49). Die Rolle des Membranpotentials beim Import mitochondrialer Vorstufenproteine war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt (18). Um diese Funktion des Membranpotentials näher zu verstehen, ist es von entscheidender Bedeutung, ob

a) das gesamte elektrochemische Potential (gesamte protonenmotorische Kraft, total proton-motive force) Δp mit den Komponenten Membranpotential $\Delta\psi$ und Protonenkonzentrationsgradient ΔpH (in mV bei 25°C:

$\Delta p = \Delta\psi - 59\text{mV} \times \Delta pH$) (1, 33, 46) am Proteinimport beteiligt ist oder

b) nur das Membranpotential $\Delta\psi$ am Import beteiligt ist.

Ein Zutreffen von a) würde auf einen Transport von Protonen (der bei vielen anderen vom Membranpotential abhängigen Prozessen wichtig ist (1, 33)) im Zusammenhang mit Proteintransfer hinweisen, während ein Zutreffen von b) vor allem auf einen elektrophoretischen Mechanismus oder eine Konformationsänderung von Membranstrukturen durch das elektrische Feld (siehe 5.) hindeuten würde. Beide Möglichkeiten sind in der Literatur diskutiert (6, 7, 15, 18, 50), allerdings war bisher eine Entscheidung nicht möglich.

In dieser Arbeit sollte nun das Problem, ob Δp oder $\Delta\psi$ allein für den Proteinimport maßgeblich sind, näher untersucht werden. Dazu war ein Importsystem notwendig, in dem einerseits eine Variation der Komponenten ($\Delta\psi$ und ΔpH) der gesamten protonenmotorischen Kraft möglich war (siehe Einleitung zu 4.2.), andererseits aber das Importsystem selbst den Import nicht störend beeinflusste (siehe Einleitung zu 4.1.).

Als Modellprotein für die Untersuchungen wurde der ADP/ATP Carrier (ADP/ATP Translocator), ein integrales Protein der Innenmembran, aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* (roter Brotschimmel) gewählt. Seine Funktion (Austausch von ADP gegen ATP) übt er in Form eines Dimers zweier identischer Untereinheiten (Molekulargewicht je 32000) aus. Das Vorstufenprotein des ADP/ATP Carriers wird ohne Präsequenz synthetisiert. Nach Translation *in vitro* in einem zellfreien System (Kaninchen-Retikulocyten-Lysat) kann der ADP/ATP Carrier in isolierte Mitochondrien von *Neurospora crassa* importiert werden, und zwar in eine Lokalisation, die einen Schutz gegen extern zugesetzte Proteasen darstellt. Bei Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials bindet die Vorstufe an Rezeptor-

proteine der mitochondrialen Außenmembran, wobei diese Lokalisation für extern zugesetzte Proteasen zugänglich ist. Ein nachfolgender Wiederaufbau des Membranpotentials führt die gebundene Vorstufe in die protease-resistente Form über. Der *in vitro* in eine proteaseresistente Lokalisation transportierte ADP/ATP Carrier zeigt gleiche lokalisatorische und funktionelle Eigenschaften wie der *in vivo* importierte ADP/ATP Carrier (z.B. Proteaseresistenz und Binden des spezifischen Inhibitors Carboxyatractylosid). (17, 23, 41 - 43, 49, 53, 54, 57, 58).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Präparation von Mitochondrien aus *Neurospora crassa*

Die Anzucht von Hyphen von *Neurospora crassa* wurde wie von Weiss et al. (51) beschrieben ausgeführt. Konidien des Wildtypstammes 74 A (Inokulum 1×10^6 /ml) wurden in Vogel's Minimalmedium mit 2 % (w/v) Saccharose bei 25°C, Beleuchtung und steriler Belüftung inkubiert. Nach 15 Stunden wurden die Hyphen durch Filtration über eine Nutsche geerntet.

Die folgenden Schritte wurden bei 0 - 4°C mit vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt. 1 g Hyphen (Absauggewicht) wurden mit 1,5 g gewaschenem Quarzsand und 0,5 ml SEM (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2 - KOH bzw. NaOH) mit 0,2 mM PMSF (zugegeben aus einer 100 mM PMSF-Lösung in Ethanol) mit Mörser und Pistill für 3 - 5 Minuten aufgerieben. Nach weiterer Zugabe von dreimal 0,5 ml SEM (mit 0,2 mM PMSF) wurde bis zur Erreichung von Homogenität gerieben. Zur Entfernung des Sandes, der Zelltrümmer und der Zellkerne wurde zweimal für 5 Minuten bei 2000 x g (Rotor SS 34, Sorvall Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde für 12 Minuten bei 17300 x g zentrifugiert. Die Mitochondrien befanden sich im Pellet. Das Pellet wurde in SEM (ohne PMSF) resuspendiert und nochmal für 12 Minuten bei 17300 x g zentrifugiert. (Die Zentrifugationsgefäße wurden bei jedem Schritt gewechselt.)

Das resultierende Pellet wurde wiederum in SEM resuspendiert. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford (8) wurde eine Konzentration an Mitochondrienprotein von 5 mg/ml eingestellt. (41, 44, 53).

3.2. Zellfreie Proteinsynthese im Kaninchen-Retikulocyten-Lysat

Zur *in vitro* Proteinsynthese nach Pelham und Jackson (35) wurde eine Portion von 0,8 ml Kaninchen-Retikulocyten-Lysat (präpariert wie beschrieben in (41, 44, 53)) unter Zugabe von 0,025 ml Häminlösung (1 mM Hämin in 90 % (v/v) Ethylenglycol, 2 mM Tris, 5 mM KCl, pH 8,2 - HCl) langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden folgende Lösungen bei 0 - 4°C zugegeben:

0,01 ml CaCl_2 (0,1M)

0,01 ml Nuclease aus *Staphylococcus aureus* (1 mg/ml)

Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend

wurden bei 0 - 4°C zugegeben:

0,05 ml EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, 0,1 M)

0,01 ml Kreatinkinase (5 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerol)

0,15 ml einer Lösung, frisch angesetzt aus

0,05 ml Kreatinphosphat (51 mg/ml Wasser)

0,05 ml KCl/MgCl₂-Lösung (2 M / 0,01 M)

0,05 ml Aminosäuremischung (0,5 - 3 mM aller L-Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin (20))

0,05 ml Gesamtnucleinsäuren aus *Neurospora crassa* (20 mg/ml, präpariert wie beschrieben in (41, 44, 53))

0,05 ml (³⁵S)Methionin (± 0,5 mCi)

Es erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 60 Minuten. Nach Abkühlung auf 0°C wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 166000 x g und 2°C (Rotor 50 Ti, Beckman Ultrazentrifuge) ein postribosomaler Überstand gewonnen. Nach Zugabe von 0,2 ml 1,5 M Saccharose-Lösung und 0,1 ml 0,5 mM Methionin-Lösung wurde der so supplementierte postribosomale Überstand (auch kurz Heißes Lysat genannt) bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt. (41, 44, 53).

Zur Herstellung nicht translatierter und unmarkierter Retikulozyten-lysate (auch kurz Kaltes Lysat genannt) wurde anstelle von Nucleinsäuren und (³⁵S)Methionin 0,1 ml Wasser zugesetzt und es wurde nicht zur Nucleasebehandlung oder zur Proteinsynthese inkubiert. Ansonsten wurde verfahren wie vorstehend beschrieben. (41).

Zur Herstellung "Entsalzter Lysate" wurde eine mit Sephadex G 25 M gepackte Säule (Pharmacia, 9 ml Säulenvolumen, (9)) mit 60 ml Puffer (200 mM Saccharose, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, pH 7,2 - NaOH) äquilibriert. Der wie vorstehend beschrieben hergestellte postribosomale Überstand wurde nur mit der Methionin-Lösung (nicht mit Saccharose) supplementiert (Endvolumen 1,255 ml) und über die Säule gegeben. Der (durch die Farbe des Hämoglobins) kräftig rote Anteil wurde aufgefangen und bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.3. Import von ADP/ATP Carrier in Mitochondrien in vitro

Bei 0 - 4°C wurde postribosomaler Überstand von Retikulozyten-Lysaten mit (³⁵S)Methionin-markierten Proteinen von *Neurospora crassa* (sog.

Heißes Lysat, hergestellt wie in 3.2. beschrieben) in Eppendorf-Gefäße pipettiert (Volumen ist bei den einzelnen Experimenten angegeben, siehe 4.). Je nach Experiment wurden Kaltes Lysat (siehe 3.2.), verschiedene Puffer (siehe 4.) und Inhibitoren oder Stimulatoren des Membranpotentials (siehe 4.) zugegeben (Kontrollansätze erhielten jeweils die gleichen Volumina an Lösungsmittel (Ethanol bzw. Wasser)). Zuletzt wurden 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM, präpariert wie in 3.1. beschrieben) zugegeben (d.h. pro Ansatz 0,025 mg Mitochondrienprotein). Nach Inkubation für 25 - 30 Minuten bei 25°C wurden die Ansätze auf 0°C abgekühlt (mindestens 15 Minuten im Eiswasserbad).

Ansätzen, bei denen nur der in Mitochondrien importierte ADP/ATP Carrier festgestellt werden sollte, wurde Proteinase K (1 mg/ml SEM) zu einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml zugesetzt (Kontrollansätze erhielten das gleiche Volumen SEM). Nach Inkubation für 30 Minuten bei 4°C wurde allen Ansätzen PMSF (100 mM in Ethanol) zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und für weitere 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch diese Behandlung mit Proteinase K wird der an die Außenmembran der Mitochondrien gebundene ADP/ATP Carrier vollständig abgebaut, während der in die Mitochondrien importierte ADP/ATP Carrier zu mindestens 90 % erhalten bleibt (41, 42).

Nach Überführen der Ansätze in neue Gefäße wurden durch Zentrifugation für 12 Minuten bei 17300 x g (Rotor SS 34, Sorvall Kühlzentrifuge) die Mitochondrien pelletiert. Nach Zentrifugation für 10 Sekunden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde auch der restliche Überstand abgehoben.

In einigen Experimenten wurden die Mitochondrien vor einer Proteasebehandlung reisoliert, in Kaltes Lysat oder verschiedene Puffer (siehe 4.) aufgenommen und ein zweitesmal bei 25°C inkubiert.

3.4. Immunpräzipitation von ADP/ATP Carrier

Das in 3.3. erhaltene Mitochondrienpellet wurde mit 0,4 ml Triton-Puffer (1 % (w/v) Triton X 100, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5 - HCl) resuspendiert. Dann wurde für 15 Minuten bei 4°C gemischt (Eppendorf-Mixer). Durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 27000 x g (Rotor SS 34, Sorvall Kühlzentrifuge) wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und erhielt 0,005 ml Antiserum gegen ADP/ATP Carrier (hergestellt wie beschrieben in (41) (Immunisierung

von Kaninchen mit ADP/ATP Carrier, der nach der Methode von Hackenberg et al. (17) isoliert wurde)). Nach Inkubation für 60 Minuten bei 4°C wurden 3,5 mg Protein-A-Sepharose CL 4B (Pharmacia; 45 Minuten bei 4°C vorgequollen in 0,07 ml des oben genannten Triton-Puffers) zugegeben und für 60 Minuten bei 4°C gemischt (Eppendorf-Mixer). Durch Zentrifugation für 20 Sekunden in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die Protein-A-Sepharose (mit den gebundenen Antikörpern und ADP/ATP Carrier) pelletiert, dreimal in dem oben genannten Triton-Puffer und einmal in 10 mM Tris, pH 7,5 - HCl, gewaschen. (21, 41, 44).

3.5. SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach Laemmli (25) durchgeführt (41, 44). Es wurden 16-prozentige Acrylamidgele mit einem Anteil von 0,1 % Bisacrylamid benutzt. Als Elektrophoresekammer diente ein System, das aus zwei übereinander angeordneten Elektrodenkammern besteht, die durch ein zwischen Glasplatten gegossenes und vertikal eingespanntes Gel während der Elektrophorese verbunden werden. Die Lösungen für das Gel (die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 angegeben) wurden zwischen zwei Glasplatten (160 x 180 mm) gegossen, die im Abstand von 1 mm gehalten wurden. Zunächst wurde ein Bodengel (20 % Acrylamid) gegossen. Nach dessen Polymerisation wurde das Trenngel (16 % Acrylamid) eingefüllt. Nach dessen Polymerisation wurde das Sammelgel (5 % Acrylamid) eingefüllt, in das ein die späteren Auftragsspalten vorformender Kamm eingesetzt wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung von 0,1 % (w/v) SDS, 0,348 M Glycin, 0,05 M Tris.

Den in 3.4. erhaltenen Proben wurde je 0,025 ml Auftragspuffer nach Laemmli (25) (2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol, 60 mM Tris, pH 6,8 - HCl, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau-Na-Salz) zugegeben. Dann wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur gemischt (Eppendorf-Mixer), 3 Minuten bei 95°C inkubiert und erneut kurz gemischt. Nach dem Abkühlen wurde für 2 Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in die vorgeformten Auftragsspalten des Sammelgels aufgetragen. Zur Eichung des Gelsystems wurde ein Gemisch von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (siehe Abb. 1), das in Auftragspuffer gelöst war, auf eine Parallelbahn aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 3 mA (über Nacht) bzw. 30 mA (am Tag) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel den Platten entnommen und für 10 Minuten in Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in Methanol/Eisessig/Wasser, 4/1/5, v/v/v) geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in Entfärbelösung (Eisessig/Wasser, 1/9, v/v), 1 Stunde in 30 % (v/v) Methanol und 1 Stunde in einer 1 M Na-Salicylat-Lösung (pH 7, mit 25 % (v/v) Methanol) geschüttelt. Die Gele wurden nach Auflegen auf Filterpapier unter Wasserstrahlvakuum bei 80°C getrocknet. Die getrockneten Gele wurden einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) aufgelegt und bei -80°C exponiert. Dann wurden die Filme entwickelt und fixiert. (41, 44). Ein Ausschnitt aus einem derartigen Film ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Zur Quantifizierung der Filmschwärzung in den einzelnen Bahnen wurde die Extinktion bei 436 nm gemessen (umgebautes Eppendorf-Photometer mit einem durch einen Motor antreibbaren Schlitten) und auf einem Schreiber (Philips PM 8000) aufgezeichnet. Von jedem Experiment wurden mindestens zwei Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten quantifiziert, um sicherzustellen, daß die erhaltenen Daten aus dem linearen Arbeitsbereich des Films stammten. Die Höhe und Halbhöhenbreite des Signals wurden gemessen, und das Produkt beider Größen als Maß für die in der Bande vorhandene Menge an Radioaktivität genommen. Die Ergebnisse wurden in sog. willkürlichen Einheiten so ausgedrückt, daß der jeweilige Maximalwert an ADP/ATP Carrier in jedem Experiment den Wert 100 annahm, und als Ordinate in linearem Maßstab in den Abbildungen des Kapitels 4. aufgetragen. Die Experimente wurden stets mehrfach durchgeführt, um für die Resultate bedeutsame Zufallsschwankungen unwahrscheinlich zu machen. Es sind jeweils die Ergebnisse eines typischen derartigen Experiments gezeigt.

3.6. Chemikalien

Chemikalien und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

(³⁵S)Methionin (500 Ci/mmol): Amersham Buchler, Braunschweig

Kreatinkinase, Nuclease aus *Staphylococcus aureus*, Proteinase K:
Boehringer, Mannheim

Tabelle 1: Zusammensetzung der Acrylamidlösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Bodengel	Trenngel	Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid + 0,2 % (w/v) Bisacrylamid	6,7 ml	8,9 ml	0,83 ml
1,875 M Tris-HCl pH 8,8	2,0 ml	-	-
1 M Tris-HCl pH 8,8	-	6,5 ml	-
0,6 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	0,5 ml
Wasser	1,1 ml	1,2 ml	3,6 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,167 ml	0,05 ml
TMED	0,025 ml	0,01 ml	0,005 ml
10 % (w/v) AMPDS	0,05 ml	0,1 ml	0,025 ml

Abb. 1: Ausschnitt aus einem Fluorogramm nach Immunpräzipitation von ADP/ATP Carrier und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Laufrichtung der Elektrophorese war von oben nach unten. Die durch den (³⁵S)Methionin-markierten ADP/ATP Carrier hervorgerufene Filmschwärzung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zur Eichung des Gelsystems wurde ein Gemisch folgender Proteine eingesetzt (40):

	Molekulargewicht
Albumin	67 000
Ovalbumin	43 000
Carboanhydrase	30 000
Trypsin-Inhibitor	20 100
Lactalbumin	14 400

Molekular-
gewicht

67 000

—

43 000

—

30 000

—



ADP/ATP Carrier

20 100

—

14 400

—

Abb. 1

Markerproteine für die SDS-Gelelektrophorese, Protein-A-Sepharose CL 4B, Sephadex G 25 M: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

Quarzsand: Riedel-de Haen, Seelze-Hannover

Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R 250, SDS, TMED: Serva, Heidelberg

Antimycin A, CCCP, Hämin, Kreatinphosphat, MOPS, Oligomycin, TMPD, Valinomycin: Sigma, München

Alle übrigen Chemikalien und Materialien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

4.1. Eigenschaften des verwendeten Systems

Üblicherweise waren Untersuchungen über den *in vitro* Import mitochondrialer Vorstufenproteine in dem zellfreien Translationssystem (zumeist Kaninchen-Retikulocyten-Lysat, siehe 3.2., im folgenden auch kurz Lysat genannt) durchgeführt worden, in dem die Vorstufenproteine synthetisiert und radioaktiv markiert wurden (18, 49). Um detailliertere Untersuchungen des Imports vornehmen zu können, erschien es günstig, ein Puffersystem zu wählen, mit dem eine Verdünnung des Lysats ohne störenden Einfluß auf Bindung und Import zu erreichen war. Andererseits sollte nach Vorbinden der Vorstufenproteine an die mitochondriale Außenmembran, nachfolgender Reisolierung der Mitochondrien und Aufnahme der Mitochondrien in den Puffer allein der Import durchführbar sein. Es wurde folgendes Puffersystem gewählt (Saccharose 250 mM, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 3 % (w/v), MOPS 10 mM, pH 7,2 - KOH) und auf seine Eigenschaften bezüglich Bindung und Import der Vorstufe des ADP/ATP Carriers untersucht. Im Verlauf dieser Arbeit wurden auch verschiedene Modifikationen der Pufferzusammensetzung untersucht.

4.1.1. Einfluß des Puffersystems auf Bindung und Import des ADP/ATP Carriers

Kaninchen-Retikulocyten-Lysate wurden bis zu 120-fach mit dem genannten Puffer verdünnt und der Einfluß auf Bindung und Import von ADP/ATP Carrier untersucht (Abb. 2). Um vergleichbare Konzentrationen an Vorstufenproteinen zu haben, wurden konstante Volumina von translatiertem und mit (^{35}S)Methionin-markiertem Lysat (sog. Heißes Lysat, siehe 3.2.) mit unterschiedlichen Volumina an nicht translatiertem und unmarkiertem Lysat (sog. Kaltes Lysat, siehe 3.2.) bzw. Puffer bis zu einem konstanten Endvolumen versetzt. Die Ansätze (a), in denen nur die Bindung gemessen werden sollte, erhielten Antimycin A + Oligomycin (Hemmung des Imports durch Abbau des Membranpotentials, siehe 4.1.2., (41, 43, 57)). Für den Import (Ansätze (b)) wurde als externe Energiequelle Ascorbat + TMPD zugegeben (siehe 4.1.2.). Durch frühere Untersuchungen (41) war bereits bekannt, daß die Zugabe von Kaltem Lysat zu Heißem Lysat keine Änderung der

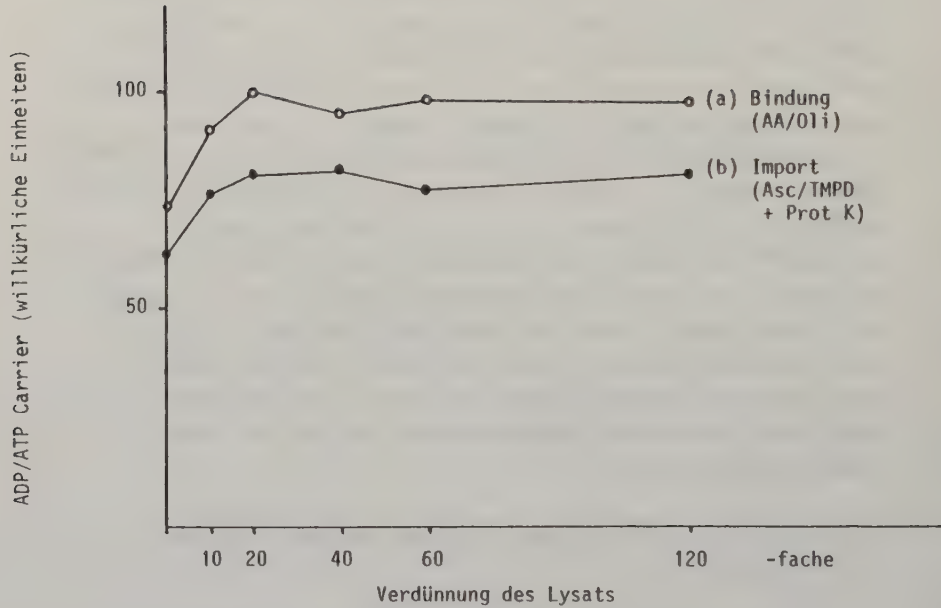


Abb. 2: Bindung und Import von ADP/ATP Carrier bei verschiedenen Verdünnungsstufen des Lysats

Jeder Ansatz erhielt 0,006 ml postribosomalen Überstand von Kaninchen-Retikulocyten-Lysaten mit (^{35}S)Methionin-markierten Vorstufenproteinen von *Neurospora crassa* (sog. Heißes Lysat, siehe 3.2.) und die am Ende der Legende angegebenen Volumina an nicht translatiertem und unmarkiertem

Lysat (sog. Kaltes Lysat, siehe 3.2.) bzw. Puffer (Saccharose 250 mM, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 3 % (w/v), MOPS 10 mM, pH 7,2 - KOH). Die Ansätze (a) (Bindung) erhielten Antimycin A + Oligomycin zu Endkonzentrationen (bezogen auf das Endvolumen von 0,72 ml nach Zugabe der Mitochondrien) von 0,004 mM und 0,01 mM (zugegeben aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol), die Ansätze (b) (Import) das gleiche Volumen an Ethanol. Den Ansätzen (b) wurde Ascorbat (200 mM in Wasser, pH 7 - KOH) zu einer Endkonzentration von 4 mM und TMPD (10 mM in Wasser) zu einer Endkonzentration von 0,2 mM zugesetzt, die Ansätze (a) erhielten das gleiche Volumen an Wasser. Nach Zugabe von 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM; hergestellt wie in 3.1. beschrieben) zu jedem Ansatz wurde für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach 15 Minuten bei 0°C erhielten die Ansätze (b) Proteinase K (1 mg/ml SEM; siehe 3.3.) zu einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml, die Ansätze (a) erhielten das gleiche Volumen SEM. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 4°C wurde allen Ansätzen PMSF (100 mM in Ethanol) zu einer Endkonzentration von 1mM zugegeben und für weitere 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Überführen in neue Gefäße und Reisolierung der Mitochondrien (siehe 3.3.) wurde der ADP/ATP Carrier immunpräzipitiert wie in 3.4. beschrieben. Nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die durch den (^{35}S)Methionin-markierten ADP/ATP Carrier hervorgerufene Schwärzung eines Röntgenfilms quantifiziert und als Ordinate in linearem Maßstab (in sog. willkürlichen Einheiten $\hat{=}$ Ausmaß der Filmschwärzung $\hat{=}$ Radioaktivität in der Bande) aufgetragen (siehe 3.5.).

Die in der Abb. bezeichneten Ansätze erhielten Kaltes Lysat bzw. Puffer in den unten angegebenen Volumina, so daß sich (zusammen mit Heißem Lysat, Mitochondriensuspension und den Zusätzen an Antimycin A + Oligomycin, Ethanol, Ascorbat + TMPD und Wasser) ein Endvolumen von 0,72 ml ergab.

Verdünnung des Lysats:

unverdünnt:	Kaltes Lysat bis 0,72 ml
10-fach:	0,066 ml Kaltes Lysat, Puffer bis 0,72 ml
20-fach:	0,030 ml Kaltes Lysat, Puffer bis 0,72 ml
40-fach:	0,012 ml Kaltes Lysat, Puffer bis 0,72 ml
60-fach:	0,006 ml Kaltes Lysat, Puffer bis 0,72 ml
120-fach:	Puffer bis 0,72 ml

Bindungs- und Importeigenschaften mitochondrialer Vorstufenproteine bewirkt.

Es zeigte sich, daß die Verdünnung des Lysats mit dem Puffer sogar zu einer Verbesserung von Bindung und Import führte (Abb. 2).

Durch frühere Untersuchungen (41) war bereits bekannt, daß die Zugabe externer Energiequellen (Pyruvat und Malat, Succinat, NADH, Ascorbat + TMPD) zum unverdünnten Lysat keine Steigerung des Imports des ADP/ATP Carriers bewirkt. Hier zeigte sich, daß bei bis zu 20-facher Verdünnung des Lysats der maximale Import auch ohne zusätzliche Gabe von Energiequellen in den Puffer erreicht werden konnte (vgl. Abb. 2 und Abb. 3). Bei höherer Verdünnung des Lysats wurde der Import vermindert (Abb. 3), offensichtlich waren die im Lysat vorhandenen endogenen Energiequellen (41) nun nicht mehr ausreichend.

4.1.2. Einfluß von Inhibitoren und Stimulatoren des mitochondrialen Membranpotentials auf den Import von ADP/ATP Carrier im Puffersystem

Untersuchungen von Schleyer et al. (41, 43) zeigten folgendes: Der Import des ADP/ATP Carriers in Mitochondrien im Kaninchen-Retikulocyten-Lysat läßt sich durch Zusatz des Protonophors CCCP vollständig hemmen. Ebenso wird durch eine Kombination von Antimycin A (Hemmung von Komplex III der mitochondrialen Atmungskette) und Oligomycin (Hemmung der mitochondrialen protontranslozierenden ATPase) der Import gehemmt (33, 41, 43). Durch Ascorbat + TMPD (Einführung von Elektronen zu Komplex IV der Atmungskette) läßt sich die durch Antimycin A + Oligomycin bewirkte Hemmung wieder aufheben. Zugabe von Kaliumcyanid (Hemmung von Komplex IV) hemmt wiederum den durch Ascorbat + TMPD bewirkten Import (33, 41, 43).

Abb. 4 zeigt, daß bei 20-facher Verdünnung des Lysats mit dem (in der Einleitung zu 4.1.) genannten Puffer dieselben Effekte wie im unverdünnten Lysat auftreten.

4.1.3. Trennung von Bindung und Import

Wird der ADP/ATP Carrier unter Aufhebung des Membranpotentials (Antimycin A + Oligomycin) an Mitochondrien gebunden, so kann er nach Reisolierung der Mitochondrien und nachfolgender Aufnahme in Kaltes Lysat (siehe 3.2.) durch

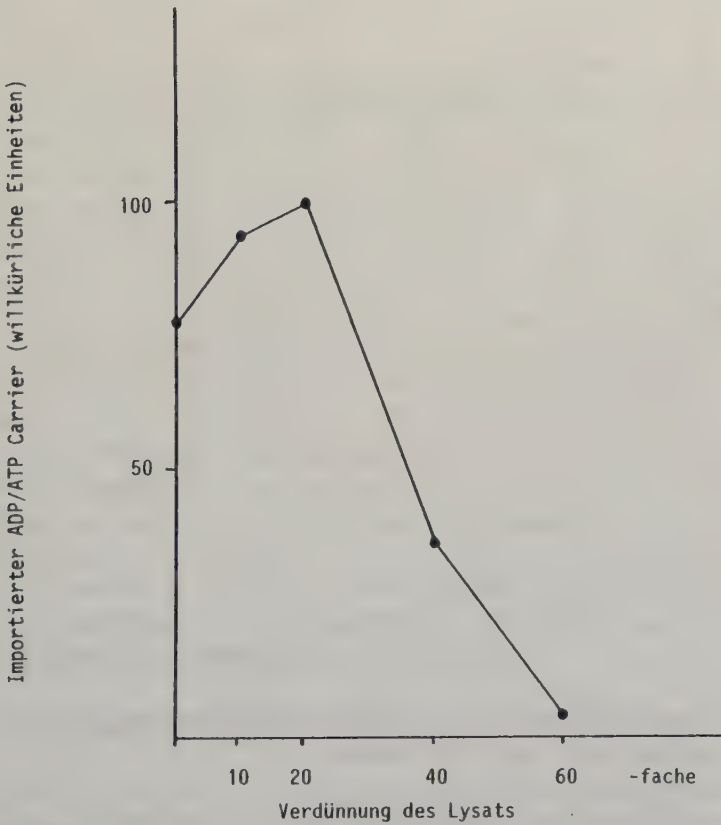


Abb. 3: Import in verdünntem Lysat ohne Zugabe externer Energiequellen

Das Experiment wurde nach dem in der Legende zu Abb. 2 beschriebenen Prinzip durchgeführt. Jeder Ansatz erhielt 0,01 ml Heißes Lysat und solche Volumina an Kaltem Lysat bzw. an Puffer (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 2), daß sich einerseits zusammen mit 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM) ein Endvolumen von 0,6 ml ergab und andererseits die in der Abb. angegebenen Verdünnungsstufen des Lysats (Heißes + Kaltes Lysat) ergaben. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 25°C wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt (siehe 3.3.) und weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

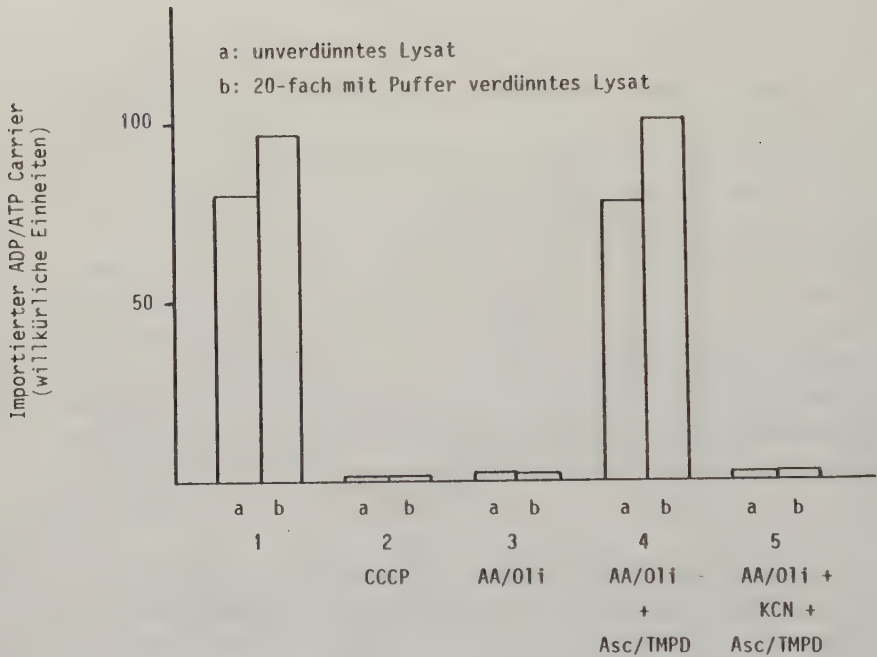


Abb. 4: Einfluß von Inhibitoren und Stimulatoren des Membranpotentials auf den Import von ADP/ATP Carrier

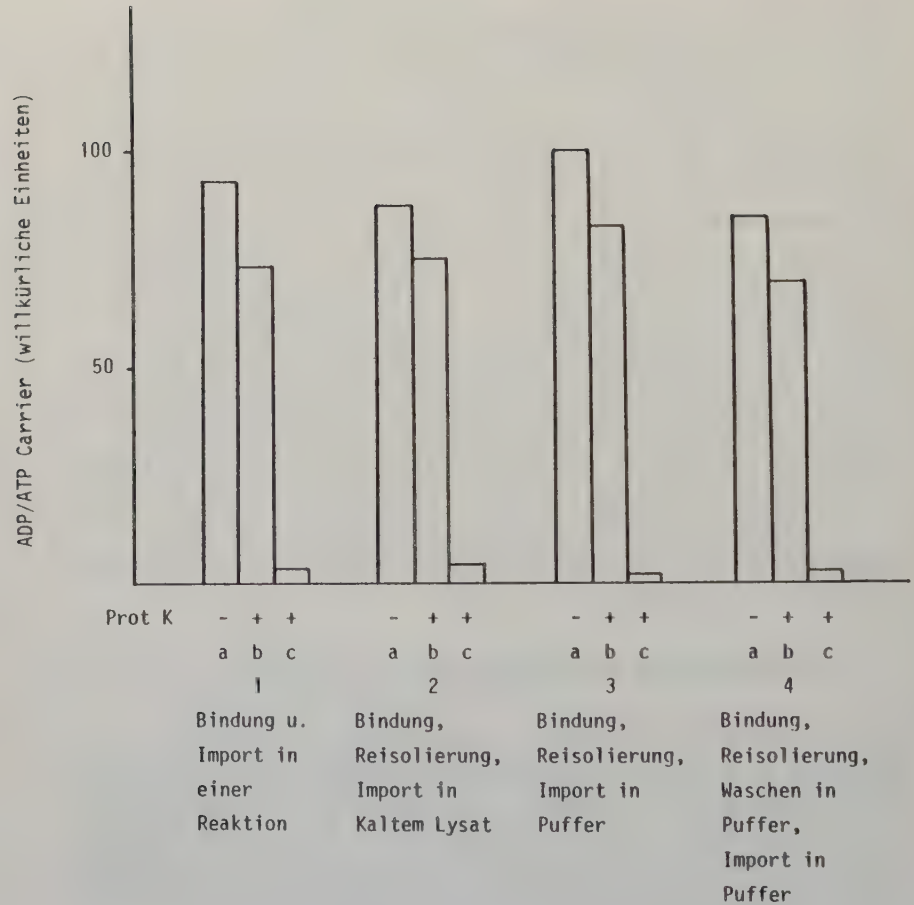
Jeder Ansatz erhielt 0,02 ml Heißes Lysat und solche Volumina von entweder Kaltem Lysat (Ansätze (a)) oder Puffer (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb.2) (Ansätze (b)); so daß sich zusammen mit den folgenden Zusätzen ein Endvolumen von 0,4 ml ergab. Den Ansätzen (2) wurde CCCP zu einer Endkonzentration von 0,01 mM zugesetzt (aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol), die Ansätze (3) bis (5) erhielten Antimycin A + Oligomycin zu den Endkonzentrationen 0,004 mM und 0,01 mM (aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol). Die Ansätze (4) und (5) erhielten zusätzlich Ascorbat + TMPD zu den Endkonzentrationen 4 mM und 0,2 mM (siehe Legende zu Abb. 2), die Ansätze (5) ferner Kaliumcyanid (50 mM in Wasser) zu einer Endkonzentration von 1 mM. Den Ansätzen ohne die jeweiligen Zusätze wurde das gleiche Volumen Lösungsmittel (Ethanol bzw. Wasser) zugegeben. Nach Zugabe von 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM) zu jedem Ansatz und Inkubation für 30 Minuten bei 25°C wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt (siehe 3.3.) und weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

Wiederaufbau des Membranpotentials (Ascorbat + TMPD) in die protease-resistente Lokalisation importiert werden (Abb. 5, Ansatz (2b)) (41, 57). Es läßt sich also eine Trennung von Bindung und Import erreichen. Dieser Import nach Reisolieren der Mitochondrien erfolgt in derselben Effizienz wie ein Import, der in einer Reaktion zusammen mit Bindung stattfindet (vgl. Ansätze (2b) und (1b) in Abb. 5) (41, 57). Bei den Ansätzen (3) wurde der ADP/ATP Carrier zunächst in Heißem Lysat an Mitochondrien gebunden (Antimycin A + Oligomycin), nach Reisolierung wurden die Mitochondrien in dem genannten Puffer (mit Antimycin A + Oligomycin) aufgenommen, Ansatz (3b) erhielt zusätzlich Ascorbat + TMPD. Nach Proteasebehandlung der Ansätze (3b) und (3c) zeigt sich, daß dieser Import im Puffer allein in gleicher Effizienz erfolgt wie im Kalten Lysat. Bei den Ansätzen (4) wurden die reisolierten Mitochondrien zunächst in Puffer (mit Antimycin A + Oligomycin) gewaschen und nach erneuter Reisolierung wie bei den Ansätzen (3) behandelt. Auch hierbei ergibt sich die gleiche Effizienz des Imports.

Es läßt sich also der Import von der Bindung trennen, wobei der Importschritt selbst durch Aufnahme der Mitochondrien in dem Puffersystem nun detaillierter untersucht werden kann.

4.1.4. Kinetik des Imports im Puffersystem

Die Vorstufe des ADP/ATP Carriers wurde bei aufgehobenem Membranpotential (Antimycin A + Oligomycin) an Mitochondrien gebunden. Nach Reisolierung wurden die Mitochondrien in dem (in der Einleitung zu 4.1.) genannten Puffer aufgenommen und für die Zeiten 0, 1, 2, 5, 10, und 15 Minuten ein Membranpotential aufgebaut (Ascorbat + TMPD). Dann wurde mit Kaliumcyanid (siehe 4.1.2.) bei 0°C jeder weitere Import gestoppt (Abb. 6). Es zeigte sich, daß der Import nahezu vollständig innerhalb von 1 Minute erfolgt.



Zusätze bei der jeweils letzten 25°C-Inkubation:

a: AA/01i

b: AA/01i + Asc/TMPD

c: AA/01i

Abb. 5

Abb. 5: Import nach Vorbinden des ADP/ATP Carriers an den Rezeptor

Jeder Ansatz erhielt 0,035 ml Heißes Lysat, Antimycin A + Oligomycin zu den Endkonzentrationen 0,004 mM und 0,01 mM (siehe Legende zu Abb. 2) und 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM). Der Ansatz (1b) erhielt zusätzlich Ascorbat + TMPD zu den Endkonzentrationen 4 mM und 0,2 mM (siehe Legende zu Abb. 2), die anderen Ansätze das gleiche Volumen an Wasser. Dann wurde für 25 Minuten bei 25°C inkubiert.

Nach 15 Minuten bei 0°C wurde den Ansätzen (1b) und (1c) Proteinase K zu einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml zugesetzt ((1a) erhielt SEM) und die Ansätze (1) wurden weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

Bei den Ansätzen (2) und (3) wurden die Mitochondrien reisoliert und dann in je 0,2 ml Kaltes Lysat (Ansätze (2)) bzw. Puffer (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 2) (Ansätze (3)) aufgenommen, die alle Antimycin A + Oligomycin (Endkonzentrationen 0,004 mM und 0,01 mM) enthielten. (2b) und (3b) enthielten zusätzlich Ascorbat + TMPD (Endkonzentrationen 4 mM und 0,2 mM) ((2a), (2c), (3a) und (3c) das gleiche Volumen an Wasser). Nach Inkubation für 15 Minuten bei 25°C und dann 15 Minuten bei 0°C wurde den Ansätzen (2b), (2c), (3b) und (3c) Proteinase K (Endkonzentration 0,02 mg/ml) zugesetzt ((2a) und (3a) erhielten SEM). Die weitere Behandlung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

Bei den Ansätzen (4) wurden die Mitochondrien reisoliert, mit dem genannten Puffer + Antimycin A + Oligomycin bei 0°C resuspendiert und erneut reisoliert. Dann wurde wie für die Ansätze (3) verfahren.

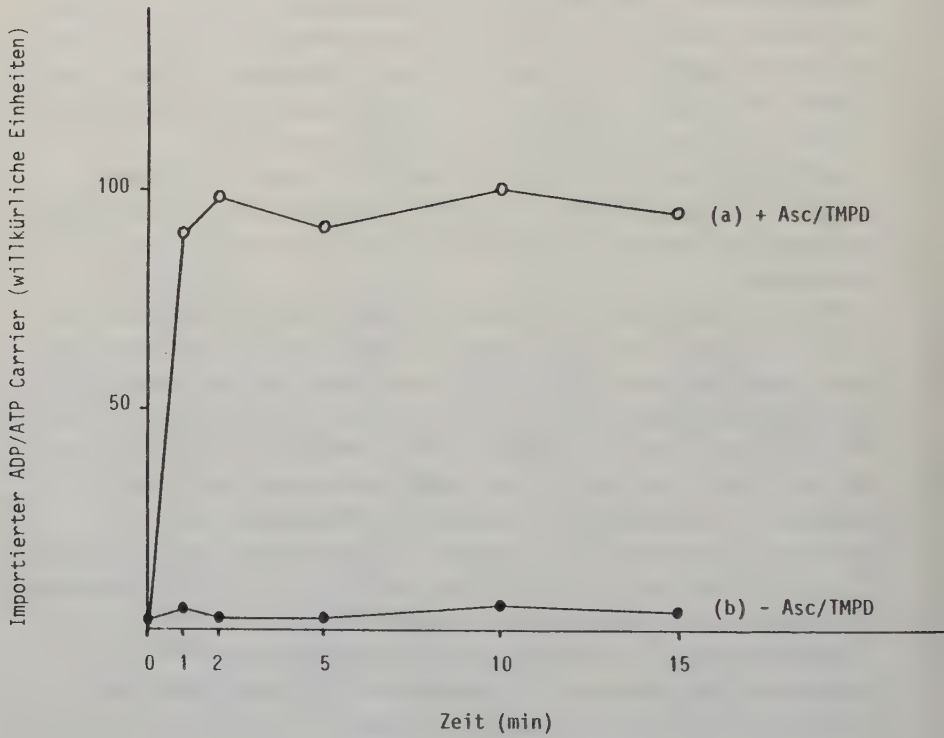


Abb. 6

Abb. 6: Kinetik des Imports im Puffersystem

Zu 0,4 ml Heißem Lysat wurden Antimycin A + Oligomycin zu den Endkonzentrationen 0,004 mM und 0,01 mM (siehe Legende zu Abb. 2) und 0,06 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM) gegeben und für 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurden sie mit 0,12 ml Puffer (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 2) einschließlich Antimycin A + Oligomycin (Endkonzentrationen 0,004 mM und 0,01 mM) bei 0°C resuspendiert. Davon wurden je 0,01 ml in das 10-fache Volumen von bei 25°C vorgewärmten Puffern (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 2) einschließlich Antimycin A + Oligomycin gegeben, wobei die Ansätze (a) zusätzlich Ascorbat + TMPD (Endkonzentrationen 4 mM und 0,2 mM) enthielten (die Ansätze (b) enthielten das entsprechende Volumen an Wasser). Die Ansätze (a) wurden für 1, 2, 5, 10 und 15 Minuten bei 25°C inkubiert, die Ansätze (b) für 0, 1, 2, 5, 10 und 15 Minuten. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Ansätze jeweils in das 5-fache Volumen von bei 0°C gehaltenen Puffern (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 2) gegeben, die Antimycin A + Oligomycin und Kaliumcyanid (Endkonzentration 1 mM; siehe Legende zu Abb. 4) enthielten. Nach mindestens 15 Minuten bei 0°C wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt (siehe 3.3.) und weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

4.2. Untersuchungen zur Rolle des Membranpotentials für den Import

Als Grundlage wurde zunächst ein System gesucht, in dem der Import des ADP/ATP Carriers von einem Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential (32, 33) getrieben werden konnte (4.2.1.).

Um entscheiden zu können, ob das Membranpotential $\Delta\psi$ allein oder die gesamte protonenmotorische Kraft Δp (mit den Komponenten $\Delta\psi$ und ΔpH) für den Import maßgeblich sind, wurden zwei verschiedene Ansätze versucht: Einerseits wurde bei gegebenem Potential eine Veränderung von ΔpH vorgenommen (4.2.2), andererseits wurde der Import durch das Kalium-Diffusionspotential in Gegenwart des Protonophors CCCP (der den durch ein Protonenpotential getriebenen Import vollständig hemmt) untersucht (4.2.3.).

4.2.1. Import durch ein Kalium-Diffusionspotential

Der Ionophor Valinomycin transportiert bevorzugt Kaliumionen (33, 38). Bei Aufnahme von Mitochondrien in einem Medium mit niedriger Kaliumkonzentration in Gegenwart von z.B. 0,1 μM Valinomycin (und bei weitgehender Hemmung der physiologischen Potentialgeber durch z.B. Antimycin A + Oligomycin, siehe 4.1.2.) läßt sich ein Kalium-Diffusionspotential erzeugen, das dieselbe Orientierung (außen positiv, innen negativ) aufweist wie das physiologische Membranpotential (32, 33).

4.2.1.1. Bindung und Import in einer Reaktion

Frisch isolierte Mitochondrien wurden in mit Puffer (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 7) 40-fach verdünntem "Entsalzten Heißen Lysat" (siehe 3.2.) bei KCl-Konzentrationen von 0,1 mM bis 100 mM aufgenommen (durch Zugabe von NaCl wurde jeweils eine konstante Konzentration einwertiger Ionen eingestellt) (Abb. 7). Die Zusätze waren Ascorbat + TMPD (Ansätze (a)) oder Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin (Ansätze (b)). Die Bindung nach 30 Minuten bei 25°C war in beiden Fällen ungestört (Daten nicht gezeigt). Während bei den Ansätzen (a) auch der Import ungestört war, wurde bei den Ansätzen (b) praktisch kein ADP/ATP Carrier importiert. Da die Bindung der Vorstufenproteine (die selbst nicht potentialabhängig ist (41, 57)) wesentlich mehr Zeit benötigt (53) als der Import (siehe 4.1.4.), scheint ein Kalium-Diffusionspotential wieder abgebaut zu werden, bevor

eine ausreichende Bindung als Voraussetzung für nachfolgenden Import erreicht ist. (Eine grundlegende Schädigung, evtl. sogar Ruptur der Mitochondrien unter derartigen Bedingungen mit Valinomycin war bereits durch frühere Untersuchungen (43) unwahrscheinlich gemacht worden.)

4.2.1.2. Import nach Vorbinden des ADP/ATP Carriers an den Rezeptor

Zur Umgehung des in 4.2.1.1. genannten Problems wurde der ADP/ATP Carrier an die mitochondriale Außenmembran vorgebunden (Abb. 8) (Hemmung des Imports durch Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin; die KCl-Konzentration im Lysat beträgt 90 - 100 mM (41)). Nach Reisolierung der Mitochondrien erfolgte eine Aufnahme in bei 25°C vorgewärmte Puffer mit KCl-Konzentrationen von 0,1 mM bis 100 mM in Gegenwart von Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin (durch Zugabe von NaCl wurde jeweils eine konstante Konzentration einwertiger Ionen eingestellt). Nun zeigte sich ein zunehmender Import bei abnehmender KCl-Konzentration (Abb. 8A), wobei eine logarithmische Auftragung der KCl-Konzentration eine annähernd lineare Abhängigkeit des Imports aufzeigt (Abb. 8B). Dieser Import erfolgt also offensichtlich in Abhängigkeit von einem Kalium-Diffusionspotential.

Anmerkungen:

a) Erneutes Reisolieren der Mitochondrien vor der Proteasebehandlung und Proteasebehandlung aller Ansätze in Puffer mit jeweils 100 mM KCl und Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin führte zu demselben Ergebnis.

b) Alle anderen getesteten Vorstufenproteine, die ebenfalls ein Membranpotential für den Import benötigen (Untereinheit 2 und Untereinheit 9 der mitochondrialen protontranslozierenden ATPase, Cytochrom c_1 und Untereinheit 5 des bc_1 -Komplexes, (49)) zeigen nach Vorbinden an die mitochondriale Außenmembran (z.B. in Gegenwart von Antimycin A + Oligomycin, siehe 4.1.3.), Reisolierung der Mitochondrien und nachfolgendem Wiederaufbau des Membranpotentials (z.B. durch Ascorbat + TMPD, siehe 4.1.3.) praktisch keinen verwertbaren Import mehr. Bei diesen Proteinen ist Import nur in einer Reaktion zusammen mit Bindung zu erreichen (44, 49, 58). Nur der ADP/ATP Carrier ist nach Reisolierung der Mitochondrien in gleicher Effizienz importierbar wie bei der Kombination von Bindung und Import in einer Reaktion (siehe 4.1.3.) (41, 57). Auf Grund dieser prinzipiellen Problematik lassen sich die Untersuchungen mit dem Kalium-Diffusionspotential derzeit nur mit dem ADP/ATP Carrier durchführen.

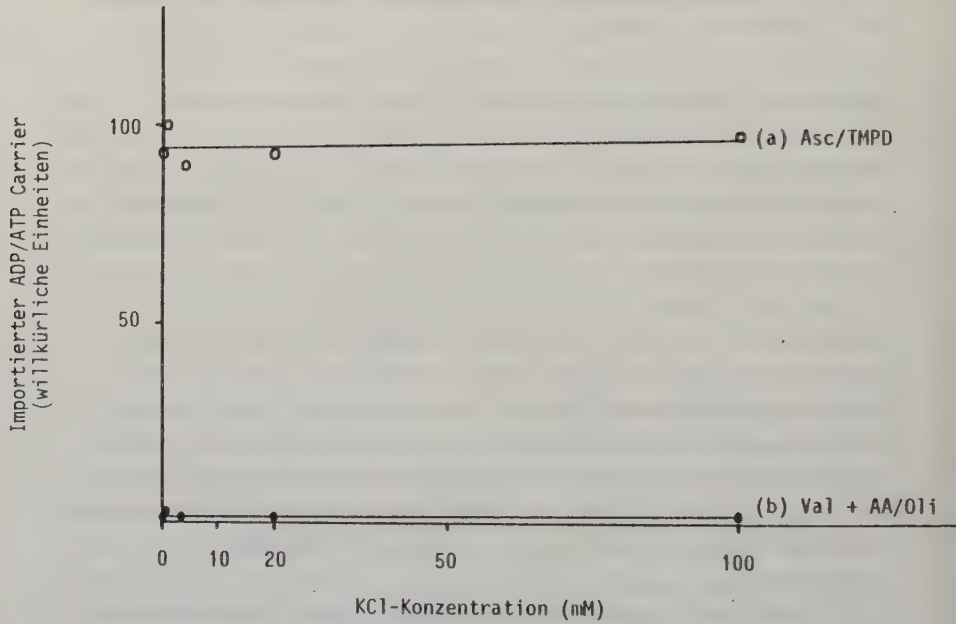


Abb. 7

Abb. 7: Import von freier Vorstufe bei verschiedenen Kalium-Konzentrationen

Jeder Ansatz erhielt 0,01 ml "Entsalztes Heißes Lysat" (siehe 3.2.) und folgenden Puffer (Saccharose 250 mM, KCl bzw. NaCl in der Gesamtendkonzentration von 100 mM, MgCl_2 5 mM, BSA 3 % (w/v), MOPS 10 mM, pH 7,2 - NaOH), wobei je nach Ansatz die KCl-Endkonzentrationen die Werte 0,1 mM, 1, 4, 20 und 100 mM hatten. Das Endvolumen einschließlich der folgenden Zusätze war 0,4 ml pro Ansatz. Die Ansätze (a) erhielten Ascorbat (pH 7 - NaOH) + TMPD zu Endkonzentrationen von 4 mM und 0,2 mM (die Ansätze (b) das entsprechende Volumen Wasser). Die Ansätze (b) erhielten Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin zu Endkonzentrationen von 0,1 μM , 0,004 mM und 0,01 mM (zugegeben aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol) (die Ansätze (a) das entsprechende Volumen Ethanol). Nach Zugabe von 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM; pH von SEM mit NaOH eingestellt) zu jedem Ansatz wurde für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach 15 Minuten bei 0°C wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt (siehe 3.3.) und weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

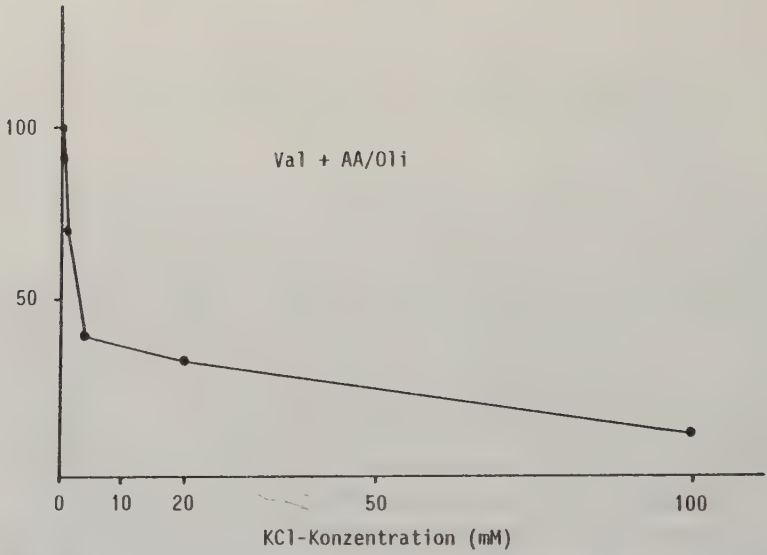


Abb. 8A

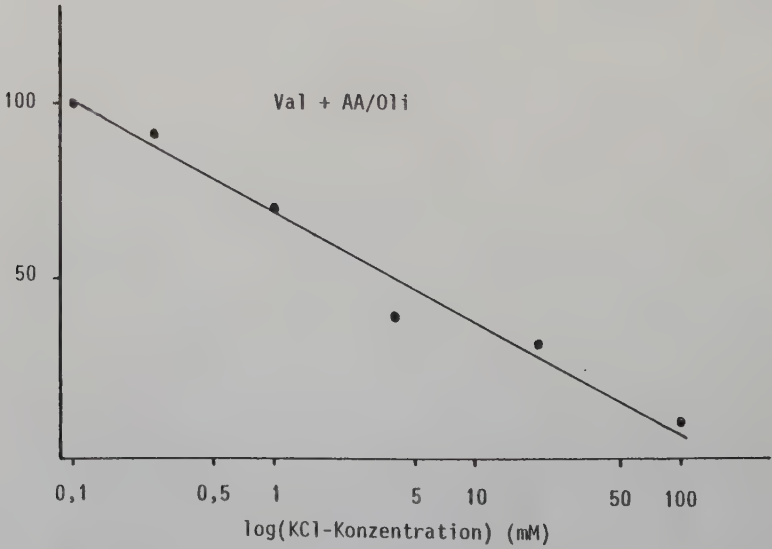


Abb. 8B

Abb. 8 (A und B): Import getrieben durch ein Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential

Jeder Ansatz erhielt 0,035 ml Heißes Lysat, Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin zu den Endkonzentrationen 0,1 μ M, 0,004 mM und 0,01 mM (zugegeben aus einer 100-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol) und 0,005 ml Mitochondriensuspension (5 mg Mitochondrienprotein/ml SEM). Nach Inkubation für 25 Minuten bei 25°C und Abkühlen auf 0°C wurden die Mitochondrien reisoliert. Die Ansätze wurden mit je 0,3 ml von bei 25°C vorgewärmten Puffern (Zusammensetzung siehe Legende zu Abb. 7; die KCl-Endkonzentrationen betrugen je nach Ansatz 0,1 mM, 0,25 mM, 1, 4, 20 und 100 mM) resuspendiert, die Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin in den oben genannten Endkonzentrationen enthielten. Die Ansätze wurden jeweils sofort für 3 Minuten bei 25°C inkubiert und dann für mindestens 15 Minuten bei 0°C gehalten. Dann wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt (siehe 3.3.) und weiterbehandelt wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben. In Abb. A wurden die KCl-Konzentrationen der zweiten 25°C - Inkubation linear aufgetragen, in Abb. B logarithmisch.

4.2.2. Import bei verschiedenen pH - Werten

ADP/ATP Carrier wurde an die mitochondriale Außenmembran gebunden (siehe 4.2.1.2.), nach Reisolierung wurden die Mitochondrien in Puffer mit pH - Werten von 6,0 bis 7,5 bei gegebenem Kalium-Diffusionspotential (konstante Kaliumkonzentration) inkubiert. Abb. 9 zeigt, daß mit zunehmender externer Protonenkonzentration keine Zunahme des Imports erzielt werden konnte. Andererseits ist zu ersehen, daß innerhalb eines pH - Bereiches von 6,0 bis 7,5 Import in etwa gleichem Ausmaß möglich ist, also keine prinzipielle Schädigung von Importstrukturen feststellbar ist.

Bei einem entsprechenden Versuch, bei dem nur Antimycin A + Oligomycin, kein Valinomycin, anwesend war, trat bei abnehmendem pH in der zweiten Inkubation ebenfalls keine Importzunahme auf (Abb. 10 Ansätze (b)) (wurde in der zweiten Inkubation Ascorbat + TMPD zugegeben, so war ebenso bei allen diesen pH - Werten etwa der gleiche Import festzustellen, Abb. 10 Ansätze (a)). Folglich ist nicht anzunehmen, daß ein möglicher Effekt von ΔpH auf den Import wegen eines H^+/K^+ Austausches (der bei Valinomycin-behandelten Mitochondrien möglicherweise auftritt (5, 15)) sich der Beobachtung entzogen hat.

Der pH in Lysaten (d.h. erste Inkubation) liegt bei 7,2. Bei der zweiten Inkubation erfolgt eine schlagartige Änderung des externen pH. Unter der Annahme, daß ein ΔpH für den Zeitraum, in dem der Import hauptsächlich abläuft (die Importkinetiken dieser Experimente sind der in Abb. 6 gezeigten Kinetik vergleichbar), erhalten bleiben sollte, zeigt sich, daß eine Vergrößerung von ΔpH bei gegebenem Membranpotential keine Zunahme des Imports bewirkt. Deshalb erscheint es unwahrscheinlich, daß die gesamte protonenmotorische Kraft $\Delta\mu$ (mit den Komponenten $\Delta\psi$ und ΔpH) für den Import maßgeblich ist.

4.2.3. Einfluß des Protonophors CCCP auf den Import durch ein Kalium-Diffusionspotential

Der Protonophor CCCP (19, 33) hemmt den durch ein Protonenpotential getriebenen Import vollständig (siehe 4.1.2.) (41, 43). Dagegen wird der durch das Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential (bei weitgehender Hemmung der physiologischen Potentialgeber durch Antimycin A + Oligomycin; siehe 4.2.1.2.) getriebene Import durch CCCP (auch in der hohen Konzentration von

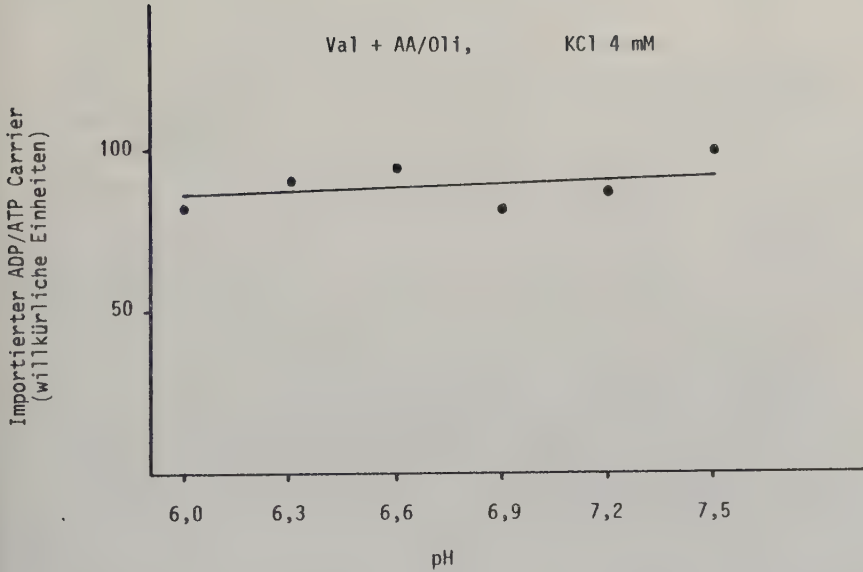


Abb. 9: Import durch ein Kalium-Diffusionspotential bei verschiedenen pH - Werten

Das Experiment wurde durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben mit folgender Änderung: Die Puffer zum Resuspendieren der Mitochondrien hatten folgende Zusammensetzung: Saccharose 220 mM, KCl 4 mM, NaCl 96 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 3 % (w/v), MOPS 15 mM, die pH - Werte (eingestellt mit NaOH bzw. HCl) sind in der Abb. angegeben.

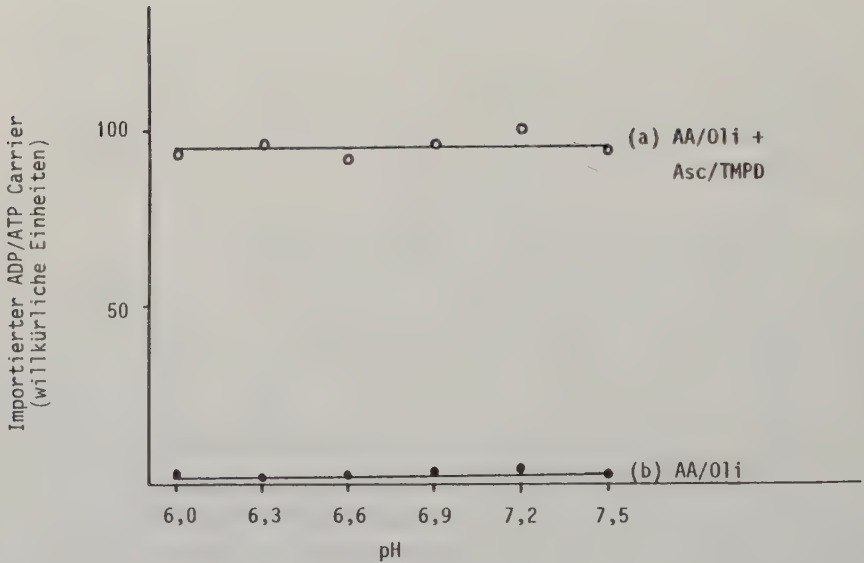


Abb. 10: Import durch ein Protonenpotential bei verschiedenen pH - Werten

Das Experiment wurde durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 9 beschrieben mit folgenden Änderungen: Es war kein Valinomycin anwesend, sondern nur Antimycin A + Oligomycin; die Puffer zum Resuspendieren der Mitochondrien enthielten KCl in einer Endkonzentration von 100 mM (kein NaCl) und bei den Ansätzen (a) zusätzlich Ascorbat + TMPD in den Endkonzentrationen von 4 mM und 0,2 mM (bei den Ansätzen (b) das entsprechende Volumen an Wasser).

0,15 mM) nur mäßig vermindert, aber nicht aufgehoben (Abb. 11A). In dieser Situation sollten praktisch alle durch die gesamte protonenmotorische Kraft getriebenen Protonen von CCCP transportiert werden. Da der Import von Proteinen weiterhin anhält, kann ein Δp abhängiger Protonentransport keine entscheidende Rolle beim Proteinimport spielen.

Um diese mäßige Verminderung des Imports in Gegenwart von CCCP zu erklären, wurde der durch ein Kalium-Diffusionspotential getriebene Import in Gegenwart und in Abwesenheit von CCCP bei verschiedenen externen Kalium-Konzentrationen gemessen (Abb. 11B). In Gegenwart von CCCP waren niedrigere KCl-Konzentrationen notwendig, um dieselbe Höhe an Import zu erzielen wie in Abwesenheit von CCCP. Zum Beispiel wurde dieselbe Höhe an Import beobachtet mit 0,5 mM KCl plus CCCP verglichen zu 4 - 5 mM KCl ohne CCCP. Untersuchungen von Nicholls (32, 33) haben gezeigt, daß die Zugabe eines Protonophors zu Mitochondrien mit einem Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential (und Hemmung der Atmungskette) bei einer externen KCl-Konzentration von 0,5 mM zu einer mäßigen Verminderung des Membranpotentials führt auf eine Höhe, die in Abwesenheit von Protonophoren bei einer KCl-Konzentration von etwa 4 mM erreicht wird. In Gegenwart eines Protonophors ist die Matrix azidifiziert (ΔpH ist umorientiert), und es erfolgt ein sofortiger Rückgang der gesamten protonenmotorischen Kraft Δp auf 0.

Der Import des ADP/ATP Carriers scheint also abhängig zu sein von der Höhe des Membranpotentials und unabhängig von der Höhe der gesamten protonenmotorischen Kraft.

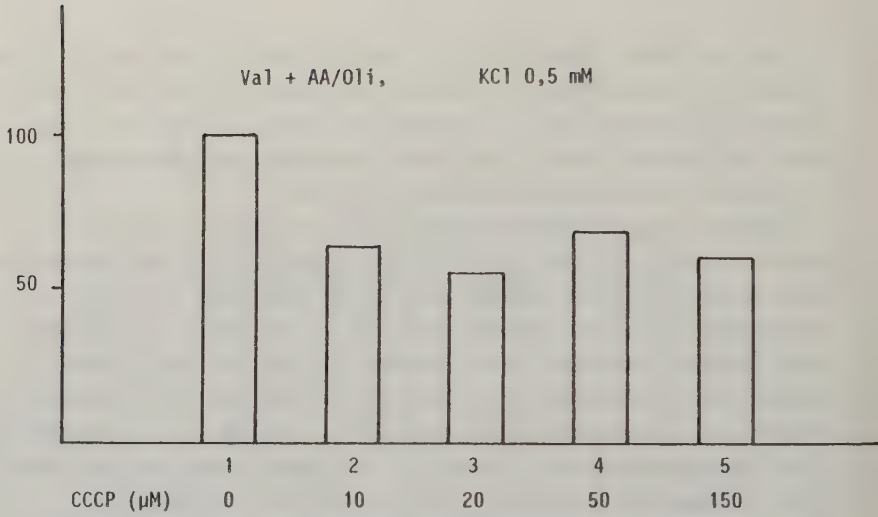


Abb. 11A

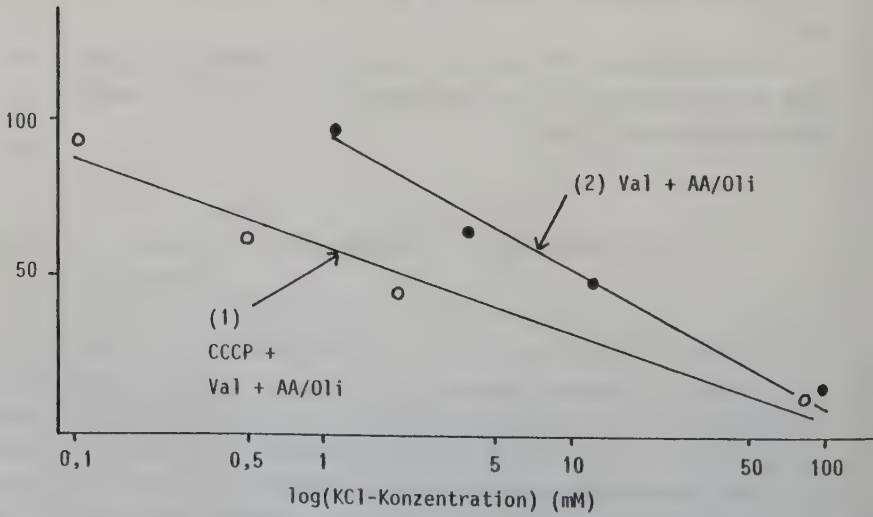


Abb. 11B

Abb. 11 (A und B): Einfluß des Protonophors CCCP auf den Import durch ein Kalium-Diffusionspotential

Die Experimente wurden durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben mit folgenden Änderungen:

Abb. 11A: Die Ansätze (2) bis (5) enthielten bei beiden 25°C - Inkubationen zusätzlich CCCP in den Endkonzentrationen 0,01 mM, 0,02 mM, 0,05 mM und 0,15 mM (zugegeben aus 200-fach konzentrierten Stammlösungen in Ethanol) (Valinomycin + Antimycin A + Oligomycin wurden ebenfalls aus einer 200-fach konzentrierten Stammlösung in Ethanol zugegeben); die Puffer zum Resuspendieren der Mitochondrien enthielten KCl in einer Endkonzentration von 0,5 mM.

Abb. 11B: Die Ansätze (1) enthielten zusätzlich CCCP in der Endkonzentration von 0,05 mM; die KCl-Endkonzentrationen in den Puffern zum Resuspendieren der Mitochondrien sind in der Abb. angegeben.

5. DISKUSSION

Der Import mitochondrialer Vorstufenproteine benötigt ein Membranpotential (außen positiv, innen negativ) über der mitochondrialen Innenmembran, sofern der Transport über bzw. in die Innenmembran erfolgt (15, 18, 43, 49). Um zu einem Verständnis der Funktion des Membranpotentials beim Proteinimport zu gelangen, ist es von entscheidender Bedeutung, ob das Membranpotential $\Delta\psi$ allein oder die gesamte protonenmotorische Kraft Δp (mit den Komponenten $\Delta\psi$ und ΔpH) für den Import maßgeblich sind (6, 7, 15, 18, 50).

Zur Untersuchung dieses Problems wurde der *in vitro* Import des ADP/ATP Carriers (ein Protein der mitochondrialen Innenmembran) herangezogen. Mit einem Puffersystem (bestehend aus Saccharose, KCl bzw. NaCl, $MgCl_2$, BSA und MOPS) konnte einerseits das Kaninchen-Retikulocyten-Lysat (in dem üblicherweise die Importuntersuchungen durchgeführt werden) bis über 100-fach verdünnt werden ohne störenden Einfluß auf Bindung und Import der Vorstufe des ADP/ATP Carriers. Wurde andererseits die Vorstufe unter Aufhebung des Membranpotentials an die mitochondriale Außenmembran gebunden, die Mitochondrien dann reisoliert und in dem Puffer allein aufgenommen, so konnte nach Wiederaufbau des Membranpotentials der Import durchgeführt werden. Dieser Import war von der gleichen Effizienz wie ein Import, der bei der bisher meist üblichen Kombination von Bindung und Import in einer Reaktion zu erzielen war. Ferner wurde gezeigt, daß der Import im Puffersystem nahezu vollständig innerhalb von einer Minute abläuft.

Der Import des ADP/ATP Carriers konnte - bei weitgehender Aufhebung der physiologischen Potentialgeber (durch Antimycin A und Oligomycin) - durch ein Kalium-Diffusionspotential getrieben werden. Dazu wurden nach Vorbinden der Vorstufenproteine an die Außenmembran die reisolierten Mitochondrien in Gegenwart von Valinomycin in Puffer mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen aufgenommen. Wurde dagegen versucht, in einer Reaktion (in Gegenwart von Valinomycin und verschiedenen Kalium-Konzentrationen) Bindung und Import gleichzeitig durchzuführen, so war kein Import zu erzielen. Da die Bindung wesentlich mehr Zeit benötigt (53) als der Import, scheint ein Kalium-Diffusionspotential bereits abgebaut zu sein, ehe eine genügende Bindung als Voraussetzung für nachfolgenden Import erreicht ist. Alle anderen untersuchten Proteine, die in bzw. über die Innenmembran

transportiert werden (siehe 4.2.1.2.), zeigen nach Vorbinden an die Mitochondrien und nachfolgender Reisolierung der Mitochondrien praktisch keinen verwertbaren Import mehr. Diese Proteine können nur importiert werden, wenn Bindung und Import in einer Reaktion stattfinden. Deshalb können die Importuntersuchungen mittels eines Kalium-Diffusionspotentials derzeit nur mit dem ADP/ATP Carrier durchgeführt werden.

Zur Untersuchung, ob $\Delta\psi$ allein oder Δp für den Import maßgeblich sind, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt:

1. Bei einem gegebenen Kalium-Diffusionspotential (bzw. bei Hemmung des Potentials mit Antimycin A + Oligomycin) wurde durch schlagartige pH - Änderung ein Δp erzeugt. Es zeigte sich, daß eine Vergrößerung des Δp keine Zunahme des Imports bewirkte. (Andererseits war der Import bei den verschiedenen pH - Werten jeweils von etwa gleichem Ausmaß, so daß eine grundlegende Schädigung von Importstrukturen durch die pH - Änderungen auszuschließen war.) Somit ist es unwahrscheinlich, daß die gesamte protonenmotorische Kraft für den Import entscheidend ist.

2. Der Protonophor CCCP (der den durch ein Protonenpotential getriebenen Import vollständig hemmt) konnte auch in hohen Konzentrationen (bis 0,15 mM) den Import durch ein Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential nicht aufheben, sondern nur mäßig vermindern. Nach Nicholls (32, 33) erfolgt in einer derartigen Situation (Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential + Hemmung der physiologischen Potentialgeber + Protonophor) eine mäßige Verminderung, aber nicht Aufhebung von $\Delta\psi$, eine Umorientierung von Δp (die Matrix wird azidifiziert) und ein sofortiger Rückgang von Δp auf 0. Die mäßige Verminderung des Proteinimports entsprach in ihrer Höhe der Verminderung von $\Delta\psi$. Der Proteinimport zeigt also eine Abhängigkeit von $\Delta\psi$ unabhängig von der Höhe von Δp . Daraus wird nun ebenfalls gefolgert, daß nicht ein Protonentransport von außen nach innen (getrieben durch die gesamte protonenmotorische Kraft) für den Proteinimport entscheidend ist, sondern daß das Membranpotential allein maßgeblich ist.

Es ergeben sich nun besonders folgende Gesichtspunkte für die Rolle des Membranpotentials beim Proteinimport:

a) Durch einen Transport von Protonen von außen nach innen, getrieben durch Δp , (der bei zahlreichen anderen Prozessen von entscheidender Bedeutung ist, die von einer energetisierten mitochondrialen Innenmembran abhängig sind, wie der Transport verschiedener kleinerer Moleküle oder die

Synthese von ATP durch die mitochondriale protontranslozierende ATPase (1, 33, 46)) kann die Funktion des Membranpotentials beim Proteinimport nicht näher erklärt werden.

b) Die meisten bisher bekannten Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine besitzen auffallend viele positive Ladungen und auch beim ADP/ATP Carrier (von dessen Vorstufe keine Präsequenz abgespalten wird) ist die Anzahl positiver Ladungen auffällig (2, 3, 22, 27, 28, 39, 48, 50, 52). Zusammen mit den hier gezeigten Daten wird ein elektrophoretischer Effekt des Membranpotentials beim Proteinimport denkbar. Unterstützt wird dieses Modell von folgender unabhängigen Beobachtung (Schleyer und Neupert, unveröffentlicht): Der Import der Untereinheit 2 der mitochondrialen protontranslozierenden ATPase, des Cytochroms c_1 und des ADP/ATP Carriers läßt sich in zwei Schritte aufteilen. Im ersten Importschritt (der bereits bei niedriger Temperatur erfolgt) wird eine energetisierte Innenmembran benötigt: Die Vorstufenproteine sind noch für extern zugesetzte Proteasen zugänglich, die Präsequenz (der Untereinheit 2 der ATPase und des Cytochroms c_1) hat bereits die Matrix erreicht (ist für die Matrixprotease zugänglich). Bei niedriger Temperatur hat also nur ein kleiner Anteil des jeweiligen Proteins die Membran überquert. Im zweiten Schritt wird dann - auch bei nicht energetisierter Innenmembran - der größere restliche Teil des Proteins in eine gegen externe Proteasen resistente Form übergeführt. Der Durchtritt der geladenen Präsequenz erfordert also ein Membranpotential. Der größere Teil des Proteins wird auch ohne Membranpotential transportiert, erfordert aber höhere Temperaturen. Dazu ergeben sich folgende Gesichtspunkte: Da aus energetischen Gründen eine vollständige Auffaltung der Proteine unwahrscheinlich ist, erfordert der Durchtritt des größeren Proteinanteils höhere Temperaturen, um die Rigidität der Membran zu senken; andererseits könnten durch die Faltung des Proteins Ladungen, die auch im restlichen Proteinanteil vorhanden sind, so weitgehend abgeschirmt werden, daß der Einfluß des Membranpotentials nicht mehr entscheidend ist.

c) Alternativ (oder in Kombination mit b)) ist folgendes Modell zu diskutieren: Durch das elektrische Feld kommt es zu einer Konformationsänderung bzw. Destabilisierung von Membranstrukturen (Proteine und/oder Lipide (10, 18, 24)), evtl. zu einer (reversiblen) Öffnung der Membran (26, 47), wodurch der Proteindurchtritt begünstigt wird. Ein wichtiges Problem ist, daß die Vorstufenproteine zahlreiche hydrophile

Teile enthalten, die in nicht abgeschirmten Zustand einen Membrandurchtritt erheblich erschweren würden (18, 49). Durch die Faltung der Proteine kann wohl nur ein Teil davon abgeschirmt werden. Die Anlagerung von Lipiden könnte einen wesentlichen Faktor zur Abschirmung darstellen, wobei hier eine Mitwirkung des Membranpotentials möglich ist.

d) Ferner könnte das Membranpotential bei der Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran mitwirken, über die dann Vorstufenproteine aufgenommen werden könnten (18, 41).

e) Weiter ist denkbar, daß die rezeptorgebundene Vorstufe durch das elektrische Feld eine solche Konformations- und/oder Lageänderung erfährt, daß sie nun die richtige Ausgangsposition für den Import einnimmt.

Das hier aufgezeigte Puffersystem kann nun als Grundlage für Messungen der absoluten Höhe von $\Delta\psi$ im Zusammenhang mit Proteinimport verwendet werden. Eine näherungsweise Kalkulation der Höhe des Diffusionspotentials in den Experimenten kann unter der Annahme einer Kalium-Konzentration von 40 - 120 mM in der Mitochondrienmatrix (33, 40) durchgeführt werden. Bereits ein Potential von 20 - 40 mV ist dann in der Lage, einen Import von ADP/ATP Carrier zu treiben. Es ist jedoch praktisch unmöglich, diese und niedrigere Potentiale an Mitochondrien zuverlässig zu messen (R. Krämer, persönliche Mitteilung), um die wichtige Frage beantworten zu können, ob ein Schwellenwert des Potentials erforderlich ist (was z.B. auf ein "öffnungsphänomen" (gating effect) hinweisen würde).

Weiterhin wird durch dieses Puffersystem eine detailliertere Untersuchung auch von anderen Aspekten des Proteinimports möglich. Zum Beispiel zeigten eigene Untersuchungen, daß zweiwertige Ionen nicht für die Bindung, aber für den Import notwendig sind; ferner, daß der Nachweis eines cytosolischen Cofaktors für den Proteinimport (4, 29, 34) von den Isolierungsbedingungen der Mitochondrien (höhere oder niedrigere Konzentrationen einwertiger Ionen) abhängig ist.

Der Export von Proteinen in Bakterien und der Import von Proteinen in Chloroplasten zeigen Gemeinsamkeiten mit dem Proteinimport in Mitochondrien. Bei diesen Transportprozessen sind für verschiedene Vorstufenproteine ein posttranslatiionaler Mechanismus, die Existenz aminoterminaler Präsequenzen und die Erfordernis von Energie beschrieben worden (12, 13, 16, 36, 37). Nach den bisher vorliegenden Daten erscheint

es jedoch möglich, daß die benötigten Energieformen im Laufe der Evolution den vorhandenen energetischen Zuständen der Membranen angepaßt wurden und somit für diese drei Transportprozesse unterschiedlich sind:

a) Bei Chloroplasten wurde die Erfordernis von ATP nachgewiesen, sowohl für den Transport über die Hüllmembranen als auch über die Thylakoidmembranen (16, 36); eine Erklärung mag darin liegen, daß das elektrochemische Potential über den Hüllmembranen zu gering ist, um als Energiequelle für den Transport zu dienen (36).

b) Für den Export von Proteinen in Bakterien wurde für zahlreiche Proteine nachgewiesen, daß das Membranpotential (und nicht ATP) die erforderliche Energieform ist (6, 11 - 14, 36, 55). Als Problem stellt sich hier, daß das Membranpotential zwar dieselbe Orientierung (außen positiv, innen negativ) aufweist wie in Mitochondrien, und die amino-terminalen Präsequenzen ebenfalls positive Ladungen aufweisen, der Transport aber in die entgegengesetzte Richtung abläuft (36). Daniels et al. (11) schlugen folgendes Modell vor, wobei nur das Membranpotential für den Import maßgeblich ist, nicht die gesamte protonenmotorische Kraft: Die amino-terminalen Sequenzen der Vorstufenproteine formen eine Haarnadelstruktur (aus zwei antiparallelen α -Helices) und bilden dabei einen Dipol, der mittels Elektrophorese über die Membran transportiert wird. Dagegen zeigten Bakker et al. (6) für den Export von β -Lactamase in *E. coli*, daß die gesamte protonenmotorische Kraft erforderlich ist und schlugen folgendes Modell vor: entweder ein Antiport von Protonen (bzw. Symport von Hydroxylionen) oder eine Konformationsänderung von Membranstrukturen vermittelt durch die gesamte protonenmotorische Kraft (36).

So stehen die Untersuchungen über den molekularen Mechanismus des Durchtritts von Proteinen durch Membranen an ihrem Anfang. Als ein Ziel für die Zukunft ist anzusehen, alle an diesen Transportprozessen beteiligten Komponenten zu isolieren und zu rekonstituieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Über 95 % der mitochondrialen Proteine werden nucleär codiert, an freien cytoplasmatischen Polysomen synthetisiert und anschließend posttranslational in die Mitochondrien importiert. Dabei erfolgt zunächst eine Bindung der Vorstufenproteine an Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran, dann der eigentliche Import, wobei der Transfer über bzw. in die Innenmembran ein Membranpotential über der Innenmembran erfordert. Der Durchtritt der Proteine durch die Membranen ist in noch weiten Teilen unverstanden, insbesondere war die Rolle des Membranpotentials beim Proteinimport zu Beginn dieser Arbeit praktisch völlig unbekannt. Für das Verständnis der Funktion des Membranpotentials ist es von entscheidender Bedeutung, ob die gesamte protonenmotorische Kraft (total proton-motive force) Δp (mit den Komponenten $\Delta\psi$ und ΔpH) oder das Membranpotential $\Delta\psi$ allein für den Proteinimport maßgeblich sind.

Zur Untersuchung dieses Problems wurde der *in vitro* Import des ADP/ATP Carriers (ein Protein der mitochondrialen Innenmembran) von *Neurospora crassa* (roter Brotschimmel) herangezogen. Es wurde gezeigt, daß mit einem Puffersystem (bestehend aus Saccharose, KCl bzw. NaCl, $MgCl_2$, Rinderserumalbumin und MOPS) das zellfreie Translationssystem (Kaninchen-Retikulocyten-Lysat), in dem bisher zumeist auch der Import untersucht worden war, bis über 100-fach verdünnt werden konnte ohne störenden Einfluß auf Bindung und Import des ADP/ATP Carriers. Wurde die Vorstufe des ADP/ATP Carriers unter Aufhebung des Membranpotentials an die mitochondriale Außenmembran gebunden, die Mitochondrien dann reisoliert und in dem Puffer allein aufgenommen, so konnte nach Wiederaufbau des Membranpotentials der Import durchgeführt werden. Der Import erfolgte nahezu vollständig innerhalb von einer Minute. Unter Verwendung dieses Puffersystems konnte nun der Import des ADP/ATP Carriers - bei weitgehender Hemmung der physiologischen Potentialgeber - durch ein Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential getrieben werden.

Zwei verschiedene Ansätze führten jeweils zu dem Schluß, daß nicht die gesamte protonenmotorische Kraft Δp , sondern das Membranpotential $\Delta\psi$ allein für den Import maßgeblich ist:

1. Bei einem gegebenen Membranpotential führte eine Vergrößerung von ΔpH nicht zu einer Zunahme des Imports.
2. Der Import durch ein Valinomycin-Kalium-Diffusionspotential konnte auch

durch hohe Konzentrationen eines Protonophors (der den durch ein Protonenpotential getriebenen Import vollständig hemmt) nicht aufgehoben, sondern nur mäßig vermindert werden. Diese Importverminderung entspricht der erwarteten Verminderung des Membranpotentials $\Delta\psi$, wobei in dieser Situation Δp den Wert 0 hat (ΔpH ist umorientiert).

Aus diesen Untersuchungen wird gefolgert, daß die Rolle des mitochondrialen Membranpotentials für den Import mitochondrialer Vorstufenproteine nicht durch den Transport von Protonen von außen nach innen (der bei vielen anderen vom Membranpotential abhängigen Prozessen wichtig ist) näher erklärt werden kann. Es wird vielmehr ein elektrophoretischer Effekt des Membranpotentials auf positiv geladene Protein-Domänen denkbar, die bei den meisten bisher untersuchten mitochondrialen Vorstufenproteinen vorhanden sind. Alternativ oder kombiniert mit der vorgenannten Möglichkeit kommt auch eine Konformationsänderung bzw. Destabilisierung von Membranstrukturen unter dem Einfluß des elektrischen Feldes in Betracht, wodurch der Proteinimport begünstigt werden könnte.

Das hier gezeigte Puffersystem kann nun auch für detailliertere Untersuchungen von anderen Aspekten des Proteinimports angewendet werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York
- (2) Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. und Klingenberg, M. (1982). Complete amino-acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef-heart mitochondria. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 345-349
- (3) Arends, H. und Sebald, W. (1984). Nucleotide sequence of the cloned mRNA and gene of the ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 3, 377-382
- (4) Argan, C., Lusty, C.J. und Shore, G.C. (1983). Membrane and cytosolic components affecting transport of the precursor for ornithine carbamyltransferase into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 258, 6667-6670
- (5) Azzone, G.F., Bartolotto, F. und Zanotti, A. (1978). Induction of electroneutral exchanges of H^+ with K^+ in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 96, 135-140
- (6) Bakker, E.P. und Randall, L.L. (1984). The requirement for energy during export of β -lactamase in *Escherichia coli* is fulfilled by the total protonmotive force. *EMBO J.* 3, 895-900
- (7) Blumenthal, R., Kempf, C., Renswoude, J.V., Weinstein, J.N. und Klausner, R.D. (1983). Voltage-dependent orientation of membrane proteins. *J. Cellular Biochemistry* 22, 55-67
- (8) Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- (9) Cooper, T.G. (1981). *Biochemische Arbeitsmethoden*. de Gruyter, Berlin
- (10) Cullis, P.R. und de Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420
- (11) Daniels, C.J., Bole, D.G., Quay, S.C. und Oxender, D.L. (1981). A role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5396-5400
- (12) Date, T., Goodman, J. und Wickner, W. (1980). Procoat, the precursor

- of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4669-4673
- (13) Date, T., Zwizinski, C., Ludmerer, S. und Wickner, W. (1980). Mechanism of membrane assembly: effects of energy poisons on the conversion of soluble M13 coliphage procoat to membrane-bound coat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 827-831
 - (14) Enequist, H.G., Hirst, T.R., Harayama, S., Hardy, S.J.S. und Randall, L.L. (1981). Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **116**, 227-233
 - (15) Gasser, S.M., Daum, G. und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13034-13041
 - (16) Grossman, A., Bartlett, S. und Chua, N.H. (1980). Energy dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature* **285**, 625-628
 - (17) Hackenberg, H., Riccio, P. und Klingenberg, M. (1978). The biosynthesis of the mitochondrial ADP,ATP translocator. *Eur. J. Biochem.* **88**, 373-378
 - (18) Hay, R., Böhni, P. und Gasser, S.M. (1984). How mitochondria import proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 65-87
 - (19) Heytler, P.G. (1979). Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Meth. Enzymol.* **LV**, 462-472
 - (20) Hunt, T. und Jackson, R.J. (1974). The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. In: *Modern Trends in Human Leukaemia* (Neth, R. et al., eds.), S. 300-307, J.F. Lehmanns Verlag, München
 - (21) Janes, M. (1984). Vergleichende Untersuchungen über die Synthese sekretorischer, mitochondrialer und glyoxysomaler Proteine an freien oder membrangebundenen Polysomen in *Neurospora crassa*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fachbereiche, Universität Göttingen
 - (22) Kaput, J., Goltz, S. und Blobel, G. (1982). Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the pre sequence for protein transport into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 15054-15058
 - (23) Klingenberg, M., Aquila, H. und Riccio, P. (1978). Isolation of functional membrane proteins related to or identical with the ADP,ATP

carrier of mitochondria. *Meth. Enzymol.* **LVI**, 407-414

- (24) Komor, E., Weber, H. und Tanner, W. (1979). Greatly decreased susceptibility of nonmetabolizing cells towards detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1814-1818
- (25) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 680-685
- (26) Lindner, P., Neumann, E. und Rosenheck, K. (1977). Kinetics of permeability changes induced by electric impulses in chromaffin granules. *J. Membrane Biol.* **32**, 231-254
- (27) Maarse, A.C., Van Loon, A.P.G.M., Riezman, H., Gregor, J., Schatz, G. und Grivell, L.A. (1984). Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J.* **3**, 2831-2837
- (28) Marres, C.A.M., Van Loon, A.P.G.M., Oudshoorn, P., Van Steeg, H., Grivell, L.A. und Slater, E.C. (1985). Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron-sulphur protein. *Eur. J. Biochem.* **147**, 153-161
- (29) Miura, S., Mori, M. und Tatibana, M. (1983). Transport of ornithine carbamoyltransferase precursor into mitochondria. Stimulation by potassium ion, magnesium ion, and a reticulocyte cytosolic protein(s). *J. Biol. Chem.* **258**, 6671-6674
- (30) Nelson, N. und Schatz, G. (1979). Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4365-4369
- (31) Neupert, W. und Schatz, G. (1981). How proteins are transported into mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **6**, 1-4
- (32) Nicholls, D.G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* **50**, 305-315
- (33) Nicholls, D.G. (1982). *Bioenergetics*. Academic Press, London
- (34) Ohta, S. und Schatz, G. (1984). A purified precursor polypeptide requires a cytosolic protein fraction for import into mitochondria. *EMBO J.* **3**, 651-657
- (35) Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*

67, 247-256

- (36) Randall, L.L. (1985). The function of protonmotive force in translocation of protein across membranes. *Meth. Enzymol.*, im Druck
- (37) Randall, L.L. und Hardy, S.J.S. (1984). Export of protein in bacteria. *Microbiological Reviews* **48**, 290-298
- (38) Reed, P.W. (1979). Ionophores. *Meth. Enzymol.* **LV**, 435-454
- (39) Sadler, I., Suda, K., Schatz, G., Kaudewitz, F. und Haid, A. (1984). Sequencing of the nuclear gene for the yeast cytochrome c_1 precursor reveals an unusually complex amino-terminal presequence. *EMBO J.* **3**, 2137-2143
- (40) Scarpa, A. (1979). Transport across mitochondrial membranes. In: *Membrane Transport in Biology* (Giebisch, G., Tosteson, D.C. and Ussing, H.H., eds.) II. Transport across single biological membranes (Tosteson, D.C., ed.), 263-356, Springer Verlag Berlin
- (41) Schleyer, M. (1984). Zur Biogenese von Mitochondrien. Der Transport der Vorstufe des ADP/ATP Carriers in Mitochondrien *in vitro*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fachbereiche, Universität Göttingen
- (42) Schleyer, M. und Neupert, W. (1984). Transport of ADP/ATP carrier into mitochondria. Precursor imported *in vitro* acquires functional properties of the mature protein. *J. Biol. Chem.* **259**, 3487-3491
- (43) Schleyer, M., Schmidt, B. und Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **125**, 109-116
- (44) Schmidt, B. (1983). Untersuchungen über den Transport der Untereinheit 9 der mitochondrialen ATP-Synthase in Mitochondrien. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fachbereiche, Universität Göttingen
- (45) Schmidt, B., Wachter, E., Sebald, W. und Neupert, W. (1984). Processing peptidase of *Neurospora* mitochondria. Two-step cleavage of imported ATPase subunit 9. *Eur. J. Biochem.* **144**, 581-588
- (46) Stryer, L. (1983). *Biochemie*. Vieweg, Braunschweig
- (47) Sugar, I.P. und Neumann, E. (1984). Stochastic model for electric field-induced membrane pores electroporation. *Biophysical Chemistry* **19**, 211-225

- (48) Takiguchi, M., Miura, S., Mori, M., Tatibana, M., Nagata, S. und Kaziro, Y. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for rat ornithine carbamoyltransferase precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7412-7416
- (49) Teintze, M. und Neupert, W. (1983). Biosynthesis and assembly of mitochondrial proteins. In: *Cell Membranes: Methods and Reviews* (Elson, E., Frazier, W.A. und Glaser, L., eds.) Vol. **1**, 89-115, Plenum Publishing Co., New York
- (50) Viebrock, A., Perz, A. und Sebald, W. (1982). The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. *EMBO J.* **1**, 565-571
- (51) Weiss, H., Jagow, G.v., Klingenberg, M. und Bücher, T. (1970). Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria prepared with a grind-mill. *Eur. J. Biochem.* **14**, 75-82
- (52) Wright, R.M., Ko, C., Cumsy, M.G. und Poyton, R.O. (1984). Isolation and sequence of the structural gene for cytochrome c oxidase subunit VI from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**, 15401-15407
- (53) Zimmermann, R. (1980). Zur Biogenese der mitochondrialen Membranproteine ADP,ATP Carrier und Cytochrom c sowie der glyoxysomalen Isocitratlyase. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Göttingen
- (54) Zimmermann, R. und Neupert, W. (1980). Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **109**, 217-229
- (55) Zimmermann, R. und Wickner, W. (1983). Energetics and intermediates of the assembly of protein ompA into the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**, 3920-3925
- (56) Zwizinski, C. und Neupert, W. (1983). Precursor proteins are transported into mitochondria in the absence of proteolytic cleavage of the additional sequences. *J. Biol. Chem.* **258**, 13340-13346
- (57) Zwizinski, C., Schleyer, M. und Neupert, W. (1983). Transfer of proteins into mitochondria. Precursor to the ADP/ATP carrier binds to receptor sites on isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258**, 4071-4074
- (58) Zwizinski, C., Schleyer, M. und Neupert, W. (1984). Proteinaceous

receptors for the import of mitochondrial precursor proteins. J. Biol. Chem. 259, 7850-7856

Lebenslauf

Am 10. September 1956 wurde ich als zweites von fünf Kindern des Steinmetzes Anton Pfanner und seiner Ehefrau Martina in Simmerberg im Allgäu geboren.

Von 1962 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in Scheffau im Allgäu. 1967 trat ich in das Gymnasium Lochau am Bodensee ein. 1971 wechselte ich auf das Bodenseegymnasium in Lindau, an dem ich 1976 mit dem Abitur abschloß. Nach Ableistung des Zivildienstes im Kreiskrankenhaus Wangen im Allgäu begann ich im Sommersemester 1978 mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Mai 1984 legte ich die Ärztliche Prüfung ab und erhielt die Approbation als Arzt. Die Arbeit zu der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert wurde 1983 begonnen und erfolgte ab Juli 1984 ganztägig am Institut für Physiologische Chemie der Universität München.

Ich bin seit Mai 1981 mit der Krankenschwester Anita, geborene Rapp, verheiratet und habe einen zweijährigen Sohn. Meine Konfession ist römisch-katholisch.

